

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

<b>(19)【発行国】</b> 日本国特許庁（ J P ）	<b>(19)[ISSUING COUNTRY]</b> Japan Patent Office (JP)
<b>(12)【公報種別】</b> 特許公報（ B 2 ）	<b>(12)[GAZETTE CATEGORY]</b> Granted Patent (B2)
<b>(11)【特許番号】</b> 第 2913419 号	<b>(11)[PATENT NUMBER]</b> (2913419)
<b>(24)【登録日】</b> 平成 1 1 年（ 1 9 9 9 ） 4 月 1 6 日	<b>(24)[DATE OF REGISTRATION]</b> April 16, Heisei 11 (1999. 4.16)
<b>(45)【発行日】</b> 平成 1 1 年（ 1 9 9 9 ） 6 月 2 8 日	<b>(45)[DATE OF ISSUE]</b> June 28, Heisei 11 (1999. 6.28)
<b>(54)【発明の名称】</b> 大腸菌群の増殖及び検出用培地	<b>(54)[TITLE OF THE INVENTION]</b> Multiplication of coliform organisms and medium for detection
<b>(51)【国際特許分類第 6 版】</b> C12N 1/20 C12Q 1/10 //(C12Q 1/10 C12R 1:01 ) (C12Q 1/10 C12R 1:19 ) (C12Q 1/10 C12R 1:22 ) (C12Q 1/10 C12R 1:425 )	<b>(51)[IPC INT. CL. 6]</b> C12N 1/20 C12Q 1/10 //(C12Q 1/10 C12R 1:01 ) (C12Q 1/10 C12R 1:19 ) (C12Q 1/10 C12R 1:22 ) (C12Q 1/10 C12R 1:425 )

**【 F I 】**

C12N 1/20

A

C12Q 1/10

**[FI]**

C12N 1/20

A

C12Q 1/10

**【請求項の数】 2****[NUMBER OF CLAIMS] 2****【全頁数】 9****[NUMBER OF PAGES] 9****(21) 【出願番号】**

特願平 2-157064

**(21)[APPLICATION NUMBER]**

Japanese Patent Application Heisei 2-157064

**(22) 【出願日】**平成 2 年 ( 1 9 9 0 ) 6 月 1 5  
日**(22)[DATE OF FILING]**

June 15, Heisei 2 (1990. 6.15)

**(65) 【公開番号】**

特開平 4-51890

**(65)[UNEXAMINED PUBLICATION NUMBER]**

Unexamined Japanese Patent Heisei 4-51890

**(43) 【公開日】**平成 4 年 ( 1 9 9 2 ) 2 月 2 0  
日**(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]**

February 20, Heisei 4 (1992. 2.20)

**【審査請求日】**

平成 9 年 ( 1 9 9 7 ) 1 月 7 日

**[DATE OF EXAMINATION]**

January 7, Heisei 9 (1997. 1.7)

**(73) 【特許権者】****(73)[PATENT HOLDER]****【識別番号】**

999999999

**[ID CODE]**

999999999

**【氏名又は名称】**

日水製薬株式会社

**[NAME OR APPELLATION]**

Nissui Pharmaceuticals, Inc.

**【住所又は居所】**

東京都豊島区巣鴨 2 丁目 1 1 番

**[ADDRESS OR DOMICILE]**

1 号

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

小高 秀正

Odaka Hidemasa

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

茨城県結城市北南茂呂 1 2 6 5  
— 5

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

水落 慎吾

Mizuochi Shingo

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

茨城県猿島郡総和町上辺見 4 7  
4 — 1

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

中楯 卓

Nakatate Suguru

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

埼玉県春日部市豊町 5 — 1 — 1  
1 アーバンハイム 2 0 3

(74) 【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

[NAME OR APPELLATION]

有賀 三幸 (外 2 名)

Ariga Mitsuyuki (other two)

## 【審査官】

吉住 和之

## [PATENT EXAMINER]

Yoshizumi Kazuyuki

## (58) 【調査した分野】

(Int. Cl. 6, DB名)

C12N 1/20

C12Q 1/10

CA (STN)

BIOSIS

## (58)[FIELD OF SEARCH]

IPC 6

C12N 1/20

C12Q 1/10

CA(STN)

BIOSIS

## (57) 【特許請求の範囲】

## (57)[CLAIMS]

## 【請求項 1】

重量で、ペプトン 1.0～2.5%、塩化ナトリウム 0.25～0.5%、酵母エキス 0.4～0.6%、グリセロール 0.5～1.5%、リン酸一水素二カリウム 0.2～0.5%、ピルビン酸ナトリウム 0.05～5.0%、硝酸カリウム 0.05～1.0%、牛胆汁末 1.0～2.0%及び寒天 0.1～0.3%を含有する大腸菌群増殖用培地。

## [CLAIM 1]

Medium for coliform organisms multiplication which contains 1.0 to 2.5% of peptone, 0.25 to 0.5% of sodium chloride, 0.4 to 0.6% of yeast extract, 0.5 to 1.5% of glycerols, 0.2 to 0.5% of phosphoric-acid 1 hydrogen dipotassium, 0.05 to 5.0% of sodium pyruvates, 0.05 to 1.0% of potassium nitrate, 1.0 to 2.0% of cow bile powder, and 0.1 to 0.3% of agar by weight.

## 【請求項 2】

重量で、ペプトン 1.0～2.5%、塩化ナトリウム 0.25～0.5%、酵母エキス 0.4～0.6%、グリセロール 0.5～1.5%、リン酸一水素二カリウム 0.2～0.5%、ピルビン酸ナトリウム 0.05～5.0%、硝酸カリウム 0.05～1.0%、牛胆汁末 1.0～2.0%、寒天 0.1～0.3%及び 4-メチルーウンベリフェリルーβ-D-ガラクトシド又は 4-メチルーウンベリ

## [CLAIM 2]

Medium for coliform organisms detection which contains 1.0 to 2.5% of peptone, 0.25 to 0.5% of sodium chloride, 0.4 to 0.6% of yeast extract, 0.5 to 1.5% of glycerols, 0.2 to 0.5% of phosphoric-acid 1 hydrogen dipotassium, 0.05 to 5.0% of sodium pyruvates, 0.05 to 1.0% of potassium nitrate, 1.0 to 2.0% of cow bile powder, 0.1 to 0.3% of agar, 4-methyl-umbelliferyl- (beta)-D-galactoside, or 4-methyl-umbelliferyl- (beta)-D-glucuronide by weight.

フェリルーβ-D-グルクロニ  
ドを含有する大腸菌群検出用培  
地。

**【発明の詳細な説明】****[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]****【産業上の利用分野】****[INDUSTRIAL APPLICATION]**

本発明は大腸菌群の増殖用培地、更に詳しくは、ジェネレーションタイムが速く、増殖率がよく、ラッグフェイズがなく、大腸菌群の検出用培地に適した培地に関する。

This invention relates to medium for multiplication of coliform organisms (in more detail, generation time is quick, growth ratio is good, there is no lag phase, and it is medium appropriate to medium for detection of coliform organisms).

**【従来技術】****[PRIOR ART]**

近年、微生物の汚染を防止するという社会的要請の強まりによって、食品、医薬品、化粧品、飲料水、尿等中に存在する大腸菌群を検査することが盛んになってきた。

Inspecting coliform organisms which exists in foodstuffs, pharmaceutical, cosmetics, drinking water, urine, etc. from rise of social requirement of preventing contamination of microorganisms in recent years has prospered.

従来から行われている大腸菌群の検査法としては、デゾキシコレート培地を用いて 24 時間培養した後、発育した菌のコロニー数を算出する方法、あるいはブリリアントグリーン乳糖ブイヨン (BGLB)、乳糖ブイヨン等を用いて 24~48 時間培養した後、ガスの産生が認められる試験管の本数を数えて菌数を算定する方法が知られている。

As examination of coliform organisms conventionally performed, the method of counting number of test tube with which production of gas is observed, and calculating the number of microbes, after cultivating for 24 to 48 hours using the method of computing colony count of microbe which grew after cultivating for 24 hours using desoxycholate medium or brilliant-green lactose bouillon (BGLB), lactose bouillon, etc. is recognized.

しかし、これらの方法は長時間を要し、現在の流通体制に適

However, these method requires long time, rapid examination is desired in order to adapt the present circulation organization, rapid detection method using electric resistance

合するためには迅速な検査法が望まれ、微生物が増殖する際に変化する電氣的抵抗を利用した迅速検出法や、微生物のもつ ATP を測定する方法等が開発された。しかし、これらの方法は、選択性及び精度性の点で必ずしも満足できるものではなかった。

また、近年、4-メチルーウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド (4-MUGal) を含む栄養培地を使用して、大腸菌群が産生する β-ガラクトシダーゼによって 4-MUGal を 4-メチルーウンベリフェロン (4-MU) に変化させ、この 4-MU の蛍光を測定する大腸菌群の迅速検出法が報告された (特開昭 56-64797 号及び特開昭 57-144995 号)。

which varies when microorganisms propagate, the method of measuring ATP which microorganisms have, etc. are developed.

However, these method was not what can not necessarily be satisfied in respect of selectivity and accuracy property.

Moreover, nutrient medium containing 4-methyl-umbelliferyl- (beta)-D-galactoside (4-MUGal) are used in recent years, rapid detection method of coliform organisms which 4-MUGal is changed to 4-methyl-umbelliferone (4-MU), and measures this fluorescence of 4-MU by (beta)- galactosidase which coliform organisms produces is reported (Unexamined-Japanese-Patent No. 56-64797 and No. 57-144995).

**【発明が解決しようとする課題】**

しかるところ、4-MUGal を用いる検出法では、大腸菌群数が試料原液 1ml あたり  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  以上必要なため、食品等の比較的菌数の少ない大腸菌群を検出するには培養操作が必要となり、大腸菌群をより速く増殖させる培地が要求される。

そして、従来再也よいとされている大腸菌群増殖用培地は、特開昭 56-64797 号公報に記載のブレインハートインフュージ

**[PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION]**

However, in detection method using 4-MUGal, coliform bacteria count is required per 1 ml of sample stock solutions, and for more than  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ .

Therefore, culture operation is required in order to detect coliform organisms with comparatively less the numbers of microbes, such as foodstuffs, medium which proliferates coliform organisms more quickly is required.

And medium for coliform organisms multiplication said to be formerly the best is brain-heart-infusion broth \* bouillon medium

ジョンブロス・ブイヨン培地 (BHI) of Unexamined-Japanese-Patent No. 56-64797. (BHI) であるが、これも未だ 56-64797. However, this cannot yet be satisfied sufficiently, either and medium for coliform organisms multiplication whose growth ratio generation time is quicker and is good and which moreover does not have lag phase is desired.

十分に満足できるものでなく、  
よりジェネレーションタイムが  
速く、増殖率がよく、しかもラ  
ッグフェイズがない大腸菌群増  
殖用培地が望まれていた。

**【課題を解決するための手段】**

斯かる実情において、本発明者は鋭意研究を行った結果、上記目的にあった培地を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、重量で、ペプトン 1.0～2.5%、塩化ナトリウム 0.25～0.5%、酵母エキス 0.4～0.6%、グリセロール 0.5～1.5%、リン酸一水素二カリウム 0.2～0.5%、ピルビン酸ナトリウム 0.05～5.0%、硝酸カリウム 0.05～1.0%、牛胆汁末 1.0～2.0% 及び寒天 0.1～0.3% を含有する大腸菌群増殖用培地に係る第 1 の発明と、この培地に更に、4-メチルーウンベリフェリルーβ-D-ガラクトシド又は4-メチルーウンベリフェリルーβ-D-グルクロニドを含む大腸菌群検出用培地に係る第 2 の発明を提供するものである。

本明細書において、「ジェネレーションタイム」とは、初発菌数より 10 倍以上増殖したときの時間をもって、その時の菌数

**[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]**

In such a situation, this inventor did earnest research.

As a result, it succeeded in obtaining medium appropriate for the above-mentioned objective.

That is, this invention provides following:

1st invention based on medium for coliform organisms multiplication which contains 1.0 to 2.5% of peptone, 0.25 to 0.5% of sodium chloride, 0.4 to 0.6% of yeast extract, 0.5 to 1.5% of glycerols, 0.2 to 0.5% of phosphoric-acid 1 hydrogen dipotassium, 0.05 to 5.0% of sodium pyruvates, 0.05 to 1.0% of potassium nitrate, 1.0 to 2.0% of cow bile powder, and 0.1 to 0.3% of agar by weight, 2nd invention based on medium for coliform organisms detection which contains 4-methyl-umbelliferyl- (beta)-D-galactoside or 4-methyl-umbelliferyl- (beta)-D-glucuronide in this medium further.

In this specification, "Generation time" is value which multiplied coefficient 3.3 to value which deducted the number of first occurred micro-organisms (logarithmic value) from the number of microbes at that time (logarithmic value) using time when increasing 10 or more

(対数値) から初発菌数 (対数値) を差し引いた値に係数 3.3 を乗じた値で、その時までの時間を除して得られる値であり、

「増殖率」とは、初発菌数より 10 倍以上増殖したときの時間をもって、その時の菌数 (対数値) から初発菌数 (対数値) を差し引いた値に係数 3.3 を乗じた値を、その時までの時間で除して得られる値であり、また「ラッグフェイズ」とは、増殖率測定時において、ある時点でサンプリングした菌が、その前にサンプリングしたときの菌数より少なくなっている時をいうものである。そして、大腸菌群検出用培地としては、ジェネレーションタイムが 3 分未満、増殖率が 0.35 以上で、ラッグフェイズがない培地が好ましい。

本発明者は、従来公知の多くの培地について大腸菌群の生育性を試験した結果、増殖率がよく、かつラッグフェイズがなかったのは BHI のみであった。そこで、この BHI 培地中のどの組成成分が増殖因子になっているかを調べるために次の実験を行った。

#### 【実験 1】

E.coli.ATCC 11775 (普通ブイヨンで 37℃、24 時間培養したものを小分けし、ドライアイス・アルコールで瞬間凍結した

times from the number of first occurred micro-organisms, and is value obtained by then dividing time of until.

"Growth ratio" is value obtained by then dividing value which multiplied coefficient 3.3 to value which deducted the number of first occurred micro-organisms (logarithmic value) from the number of microbes at that time (logarithmic value) using time when increasing 10 or more times from the number of first occurred micro-organisms in time of until.

Moreover, "lag phase" means time of microbe sampled at a certain time decreasing from the number of microbes when sampling before that in growth ratio measuring time.

And as a medium for coliform organisms detection, generation time is less than 3 minutes, growth ratio is 0.35 or more, and medium without lag phase is desirable.

Formerly this inventor examined the growth property of coliform organisms about many media of public knowledge.

As a result, growth ratio was good and it was only BHI that there was no lag phase.

Then, the next experiment was conducted in order to examine which component in this BHI medium has proliferation factor.

#### [EXPERIMENT 1]

E. Vaccinate coli.ATCC 11775 (what is saved at -80 degrees C after packaging 37 degrees C of things cultivated for 24 hours and freezing at the moment with dry-ice \* alcohol is usually used

後-80℃で保存したものを、用時融解して使用する)を第1表に示す各培地に接種し、37℃のウォーターバスで培養し、定期的にサンプリングした後、菌数を測定し、ジェネレーションタイムと増殖率を算出した。これと同時にラッグフェイズの有無を観察した。

尚、本明細書において、菌数測定は次のようにして行われる。すなわち、細菌を接種した培地を原液とし、10倍段階希釈し、その1mlを滅菌シャーレにとり、ここにあらかじめ加温溶解し45℃ぐらいいたもってあるデゾキシコレート培地を注ぎ、ただちにシャーレを静かに動かし、よく培地と菌液を混合し、平板に固まらせ37℃24時間培養した後、菌数を測定する。

その結果を第2表に示す。

with bouillon, carrying out time-of-use fusion) into each medium shown in Table 1, it cultivates by 37-degree C water bath, after sampling regularly, the number of microbes is measured, generation time and growth ratio were computed.

Existence of lag phase was observed simultaneously with this.

In addition, in this specification, the number measurement of microbes is performed as follows.

That is, let medium which vaccinated bacteria be stock solution, phase dilution is carried out 10 times, it is pouring about desoxycholate medium which carries out heating melting of the 1 ml beforehand for sterilization Petri dish here, and has been kept at about 45 degrees C, petri dish is moved calmly immediately and septic solution is well mixed with medium, after making it solidify monotonously and cultivating 37 degrees C for 24 hours, the number of microbes is measured.

The result is shown in Table 2.

第 1 表

培 地 番 号	1	2	3	4	5	6	7	8
ポリペプトン 1 % (BBL)	+	+	+	+	+	+	+	+
塩化ナトリウム 0.5 %	-	+	-	-	+	+	-	+
リン酸－水素二カリウム 0.25%	-	-	+	-	+	-	+	+
リン酸－水素二ナトリウム 0.25%	-	-	-	+	-	+	+	+

(pH 7.0 ± 0.1)

(注) + : 含む、- : 含まない。

1st table

Medium number

Polypeptone...

Sodium chloride...

Phosphoric-acid-hydrogen 2 potassium...

Phosphoric-acid-hydrogen 2 sodium...

(Note) +: contains, - : doesn't contain.

第 2 表

培 地 番 号	ジェネレーションタイム <sup>1)</sup>	増殖率	ラッグフェイズ <sup>2)</sup>
1	4 1. 7 5	0. 0 2 4	2 / 3
2	3 1. 2 1	0. 0 3 2	1 / 3
3	2 9. 8 1	0. 0 3 4	1 / 3
4	3 6. 3 1	0. 0 2 8	0 / 3
5	1 7. 6 5	0. 0 5 7	0 / 3
6	3 9. 1 8	0. 0 2 6	1 / 3
7	2 5. 4 3	0. 0 3 9	0 / 3
8	1 8. 3 0	0. 0 5 5	0 / 3

1) 時間単位：分

2) ラッグフェイズの出現回数／実験回数

2nd table

Medium number    Generation time    Growth ratio    Lag phase

1) Time unit:    Minute

2) Number of times of occurrence and number of times of experiment of lag phase

この実験の結果から、ポリペプトン、塩化ナトリウム及びリン酸一水素二カリウムが大腸菌群の増殖に関与していることが明らかとなった。

また、特開昭 57-144995 号公報には、肝汁酸を添加して大腸菌群以外の微生物の生育を抑制

It became clear from result of this experiment that polypeptone, sodium chloride, and phosphoric-acid 1 hydrogen dipotassium are involved in multiplication of coliform organisms. Moreover, it is described by Unexamined-Japanese-Patent No. 57-144995 that bile acid can be added and growth of microorganisms other than coliform organisms

することができることが記載されている。そこで、本発明者は、牛胆汁末の添加効果について次の実験を行った。

can be inhibited.

Then, this inventor conducted the next experiment about the addition effect of cow bile powder.

**【実験 2】**

ポリペプトン 1 %、塩化ナトリウム 0.5% 及びリン酸一水素ナトリウム 0.25% を含む基礎培地に種々の濃度で牛胆汁末を添加した培地に E.coli を接種し、実験 1 と同様にして培養して菌数を測定した。その結果を第 3 表に示す。

**[EXPERIMENT 2]**

E.coli is vaccinated into medium which added cow bile powder by various concentration to basal medium containing 0.5% of sodium chloride, and 0.25% of phosphoric-acid 1 hydrogen dipotassium polypeptone 1%, it cultivated like Experiment 1 and the number of microbes was measured.

The result is shown in Table 3.

第 3 表

	ジェネレーションタイム <sup>1)</sup>	増殖率	ラグフェイズ <sup>2)</sup>
基 礎 培 地	1 4. 7 9	0. 1 0 3	1 / 3
基礎培地+牛胆汁末 0. 5 %	2 5. 7 2	0. 0 4 8	2 / 3
基礎培地+牛胆汁末 1. 0 %	6. 8 1	0. 1 5 3	0 / 3
基礎培地+牛胆汁末 1. 5 %	5. 4 3	0. 1 8 6	0 / 3
基礎培地+牛胆汁末 2. 0 %	7. 8 8	0. 1 2 5	0 / 3
基礎培地+牛胆汁末 2. 5 %	2 3. 1 2	0. 0 7 4	2 / 3
基礎培地+牛胆汁末 3. 0 %	2 0. 5 9	0. 0 9 0	1 / 3

1) , 2) は第 2 表に同じ

3rd table

Generation time    Growth ratio    Lag phase

Basal medium

Basal-medium + cow bile powder...

...

1) and 2 are the same as 2nd table.

この実験から、牛胆汁末は大腸菌群以外の微生物の生育を抑制するばかりでなく、大腸菌群の生育を促進させること、並びにその培地中の最適濃度は 1.0 ~2.0%であることが見出された。

更にまた、大腸菌群の生育に有用であることが予想される成分について次の実験を行った。

#### 実験 3

実験 2 の基礎培地に牛胆汁末 1.5%を添加した培地 (牛胆汁末添加基礎培地) に各物質を添加した第 4 表に示す培地に E.coli を接種し、実験 1 と同様にして培養後菌数を測定した。その結果を第 5 表に示す。

From this experiment, it not only inhibits growth of microorganisms other than coliform organisms, but cow bile powder promote growth of coliform organisms, the optimal concentration in the medium is 1.0 to 2.0%.

These are discovered.

Moreover, useful thing conducted the next experiment on growth of coliform organisms about component anticipated.

#### Experiment 3

E.coli is vaccinated into medium shown in Table 4 which added each matter to medium (cow bile-powder addition basal medium) which added 1.5% of cow bile powder to basal medium of Experiment 2, the number of microbes was measured after cultivating like Experiment 1.

The result is shown in Table 5.

第 4 表

培地番号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
基礎培地 + 牛胆汁酸末 1.5 %	+	+	+	+	+	+	+
硝酸カリウム 0.1 %	—	+	+	+	—	+	+
ピルビン酸ナトリウム 0.1 %	—	—	+	—	+	+	+
フマル酸ナトリウム 0.5 %	—	—	—	+	+	+	+
ギ酸ナトリウム 0.3 %	—	—	—	—	+	—	+

4th table

Medium number

Basal-medium + cow bile-acids powder...

Potassium nitrate...

Sodium pyruvate...

Fumaric-acid sodium...

Sodium formate...

第 5 表

培地番号	ジェネレーションタイム <sup>1)</sup>	増殖率	ラッグフェイズ <sup>2)</sup>
①	4.7 5	0.2 1 1	0 / 3
②	4.1 2	0.2 4 3	0 / 3
③	2.6 0	0.3 8 4	0 / 3
④	3.7 9	0.2 6 4	0 / 3
⑤	4.7 3	0.2 1 1	0 / 3
⑥	2.9 8	0.3 3 6	0 / 3
⑦	3.0 4	0.3 2 9	0 / 3

1), 2) は第 2 表に同じ

5th table

Medium number    Generation time    Growth ratio    Lag phase

1) and 2 are the same as 2nd table.

この実験の結果、牛胆汁末添加基礎培地に硝酸カリウム及びピルビン酸ナトリウムを添加した培地が、ジェネレーションタイム及び増殖率において優れていた。

本発明の培地において、ピルビン酸ナトリウムは、菌体内で各種の代謝経路を結ぶ重要な中間生成物で、ピルビン酸を添加することにより、菌体内活性を促進する作用をするものであり、その添加量は 0.05～5.0%

Medium which added potassium nitrate and sodium pyruvate was excellent in cow bile-powder addition basal medium in generation time and growth ratio as a result of this experiment.

In medium of this invention, sodium pyruvate is important intermediate product to which various kinds of metabolic pathways are connected within microbial cell, and carries out effect which promotes activity in microbial cell by adding pyruvic acid.

0.05 to 5.0% of the additional amount is desirable.

が好ましい。また硝酸カリウムはエネルギー獲得手段として大腸菌群にとって重要であり、その添加量は 0.05～1.0% が好ましい。

以上の組成の本発明培地は大腸菌群の増殖が速いので、これに 4-メチルーウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド [4-MUGal] 又は 4-メチルーウンベリフェリル-β-D-グルクロニド [4-MUGul] を含有せしめれば優れた大腸菌検出用培地が得られる。

本発明で大腸菌群とは、ラクトースを分解する能力を有する一群の微生物で、エシエリキヤ属、サイトロバクター属、クレブシエラ属、エンテロバクター属、セラチヤ属に属するものである。

本発明の培地の基質である 4-MUGal 及び 4-MUGul は培地中に  $10^{-4}\text{M}$ ～ $10^{-2}\text{M}$  程度添加するのが好ましい。

#### 【作用】

本発明の大腸菌群検出用培地を用いて、被検体中の大腸菌群の存在を検出するには、当該培地に被検体を加えて約 37℃ で数時間～十数時間培養する。基質の 4-MUGal 及び 4-MUGul は無色であるが、被検体中に大腸菌群が存在すると、これが産生する β-ガラクトシダーゼの作

Moreover, potassium nitrate is important for coliform organisms as energy acquisition means.

0.05 to 1.0% of the additional amount is desirable.

Since this invention medium of the above construction has quick multiplication of coliform organisms, medium for Escherichia-coli detection which was excellent when making this contain

4-methyl-umbelliferyl-(beta)-D-galactoside [4-MUGal] or 4-methyl-umbelliferyl-(beta)-D-glucuronide [4-MUGul] is obtained.

Group which has capability to disassemble lactose, with coliform organisms by this invention -- it is microorganisms and belongs to Escherichia genus, Citrobacter genus, Klebsiella, Enterobacter, and Serratia genus.

As for 4-MUGal and 4-MUGul which are substrate of medium of this invention, it is desirable to carry out  $10^{-4}\text{M}$ - $10^{-2}\text{M}$  level addition into medium.

#### 【OPERATION】

In order to detect presence of coliform organisms in subject using medium for coliform organisms detection of this invention, subject is added to said medium and several-hours-several dozen time culture is carried out at about 37 degrees C.

4-MUGal and 4-MUGul of substrate are achromatism.

However, if coliform organisms exists in subject,

用によって 4-メチルーウンベ  
 リフェロン(4-MU)が生成され、  
 4-MU は、蛍光性物質であり、  
 330nm の波長で励起されて、  
 450nm の蛍光を発するので、こ  
 れを測定することにより大腸菌  
 群の存在を確認することができ  
 る。

4-methyl-umbelliferone (4-MU) will be formed  
 by effect of (beta)- galactosidase which this  
 produces, 4-MU is fluorescent matter.  
 It excites on wavelength of 330 nm, 450 nm  
 fluorescence is emitted.  
 Therefore, presence of coliform organisms can  
 be checked by measuring this.

**【実施例】**

次に実施例を挙げて説明す  
 る。

**[EXAMPLES]**

Next, Example is given and demonstrated.

**【実施例 1】**

下記組成の本発明大腸菌群検  
 出用培地を調整した。

トリプチケースペプトン (BBL)

10g

フィトンペプトン (BBL)

5g

塩 化 ナ ト リ ウ ム

5g

酵 母 エ キ ス ( Difco )

5g

グ リ セ ロ ー ル

10g

リン酸一水素二カリウム

2.5g

ピルビン酸ナトリウム

1g

硝 酸 カ リ ウ ム

1g

牛 胆 汁 末

15g

寒

天

3g

**[EXAMPLE 1]**

Medium for this invention coliform organisms  
 detection of the following construction was  
 adjusted.

Trypticase

peptone

(BBL)

10g

Phyton

peptone

(BBL)

5g

Sodium

chloride

5g

Yeast

extract

(Difco)

5g

Glycerol

10g

Phosphoric-acid 1 hydrogen dipotassium

2.5g

Sodium

pyruvate

1g

Potassium

nitrate

1g

Cow

bile

powder

15g

Agar

4-MUGul	3g		
$1 \times 10^{-3}$ モル	4-MUGul		
イソプロピル $\beta$ - D - チオガラ	$1 \times 10^{-3}$ mol		
クトピラノシド	Isopropyl (beta)-D-thiogalactophranoside		
$1 \times 10^{-3}$ モル	$1 \times 10^{-3}$ mol		
精 製 水	Pure		water
1000ml	1000 ml		
	PH7.0+/-0.1		
pH7.0±0.1			

**【実施例 2】**

ハートインフュージョン培地に 4-MUGul  $1 \times 10^{-3}$  モル及びイソプロピル  $\beta$  - D - チオガラクトピラノシド  $1 \times 10^{-3}$  モルを添加した培地及び実施例 1 の大腸菌群検出用培地を用いて初発菌数と蛍光発現時間との関係と比較した。その結果を表 - 1 に示す。

なお、比較方法は両方の培地を 96 穴透明 U プレートに  $100 \mu$  l ずつ分注しておき、各濃度の菌を  $100 \mu$  l 接種し、MTP-32 MICROPLATE READER (CORONA) で蛍光の発現する時間を一時間ごとに測定した。

**[EXAMPLE 2]**

Concern between the number of first occurred micro-organisms and fluorescent expression time was compared with heart infusion medium using medium which added 4-MUGul  $1 \times 10^{-3}$  mol and isopropyl (beta)-D-thiogalactophranoside  $1 \times 10^{-3}$  mol, and medium for coliform organisms detection of Example 1.

The result is shown in Table -1.

In addition, the comparison method dispenses both of media 100 microliter at a time on 96 wells transparent U plate, 100 microliter vaccination of the microbe of each concentration is carried out, fluorescent time to express was measured for every hour by MTP-32 MICROPLATE READER (CORONA).

表 - 1

菌 株	初発菌数 (log CFU/ml)	蛍光発現時間 (時) *	
		ハートインフュージョン 培地	大腸菌群検出用培地
<i>E. coli</i> ATCC 11775	5.76	5	5
	4.81	6	6
	3.85	8	7
	2.76	24	8
	1.86	24	24
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	5.64	24	6
	4.65	24	8
	3.38	24	24
	2.45	24	24
	1.45	24	24
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	5.32	—	7
	4.28	—	8
	3.34	—	24
	2.26	—	24
	1.30	—	24
<i>K. ozaenae</i> ATCC 11296	5.04	—	7
	4.36	—	8
	3.26	—	24
	2.08	—	24
	1.40	—	24
<i>K. oxytoca</i> ATCC 13182	5.65	5	6
	4.63	7	7
	3.36	8	8
	2.71	24	24
	1.32	24	24
<i>B. cloacae</i> ATCC 13047	5.34	24	8
	4.20	24	24
	3.20	24	24
	2.23	24	24
	1.04	24	24
<i>B. aerogenes</i> ATCC 13048	5.56	24	6
	4.94	24	7
	3.63	24	24
	2.72	24	24
	0.69	24	24

\* : 4 MUの生成が  $7.5 \times 10^{-6}$  M以上

— : 24時間培養後で蛍光を認めない。

Tabl. -1

Strain

The number of first occurred micro-organisms...

Fluorescent expression time (hr)

Heart infusion medium

Medium for coliform organisms detection

\* : formation of 4MU is more than  $7.5 \times 10^{-6}$ M.

- : after 24-hour culture, and fluorescence is not observed.

## 実施例 3

実施例 2 と同じ培地を用いて、食肉製品における初発菌数と蛍光発現時間との関係を比較した。比較方法は実施例 2 と同様にして行った。その結果を表 - 2 に示す。

## Example 3

Relation of the number of first occurred micro-organisms and fluorescent expression time in meat product was compared using the same medium as Example 2.

The comparison method was performed like Example 2.

The result is shown in Table -2.

表 - 2

菌 株	初発接種菌数 (Log CFU/ml)	蛍 光 発 現 時 間 ( 時 ) *							
		ロースハム		チルドハンバーグ		ポークソーセージ		チョップドハム	
		ハート <sup>1)</sup>	大腸菌群 <sup>2)</sup>	ハート	大腸菌群	ハート	大腸菌群	ハート	大腸菌群
<i>E. coli</i> ATCC 11775	6	6	5	6	5	6	6	5	5
	5	8	6	7	6	8	7	7	6
	4	24	8	8	8	24	8	8	8
	3	24	24	24	24	24	24	24	24
	2	—	—	24	24	24	24	24	24
	1	—	—	24	—	—	—	—	—
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	5	8	6	8	6	8	6	7	6
	4	24	8	24	8	24	8	24	7
	3	24	24	24	24	24	24	24	24
	2	24	24	24	24	24	24	24	24
	1	—	—	24	24	24	24	24	24
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	5	24	6	24	8	—	7	—	6
	4	24	7	24	24	—	24	—	8
	3	24	24	24	24	—	24	—	24
	2	24	24	24	24	—	24	—	24
	1	24	24	24	24	—	24	—	—
<i>K. ozonae</i> ATCC 11296	5	24	8	24	7	—	7	—	6
	4	24	24	24	24	—	8	—	7
	3	24	24	24	24	—	24	—	24
	2	24	24	24	24	—	24	—	24
	1	—	—	24	24	—	24	—	—
<i>K. oxytoca</i> ATCC 13182	5	7	6	7	6	7	6	6	5
	4	24	8	8	8	8	7	7	7
	3	24	24	24	24	24	24	24	8
	2	24	24	24	24	24	24	24	24
	1	24	—	24	24	24	24	—	24
<i>B. cloacae</i> ATCC 13047	5	24	24	24	8	24	8	24	6
	4	24	24	24	24	24	24	24	8
	3	24	24	24	24	24	24	24	24
	2	24	24	24	24	24	24	24	24
	1	24	24	24	24	—	24	24	24
<i>B. aerogenes</i> ATCC 13048	5	24	7	24	7	24	7	24	7
	4	24	8	24	8	24	8	24	8
	3	24	24	24	24	24	24	24	24
	2	24	24	24	24	24	24	24	24
	1	24	24	24	24	24	—	24	24

\* : 4 MUの生成が $7.5 \times 10^{-6}$ M以上

1) : ハートインフュージョン培地

2) : 大腸菌群検出用培地

Table - 2

Strain

The number of initial inoculum organisms

## Fluorescent expression time (hr)

Roast ham

Heart

Coliform organisms

Chilled hamburger

Heart

Coliform organisms

Pork sausage

Heart

Coliform organisms

Chopped ham

Heart

Coliform organisms

\* : formation of 4MU is more than  $7.5 \times 10^{-6}$ M.

1): Heart infusion medium

2): Medium for coliform organisms detection

## 実施例 4

実施例 2 と同じ培地を用いて、市販食肉及び食肉製品の大腸菌群の検査を行った。その結果を表-3に示す。

検査方法は両方の培地を 96 穴透明Uプレートに 100  $\mu$  l ずつ分注しておき、そこにストマッカーで処理した検体原液 100  $\mu$  l を接種し、37℃で培養しながら一時間ごとに MTP-32 MICROPLATE

READER (CORONA) で測定し蛍光発現時間を計った (プレート法)。それと同時に、検体原液を適当に希釈しデゾキシコレート培地で混釈し (Deso 混釈法) 大腸菌群のコロニー発現数を測定し

## Example 4

Inspection of coliform organisms of commercial meat and meat product was conducted using the same medium as Example 2.

The result is shown in Table -3.

Testing method dispenses both of media 100 microliter at a time on 96 wells transparent U plate, and specimen stock-solution 100 microliter treated with Stomacher there is vaccinated, cultivating at 37 degrees C, it measured by MTP-32 MICROPLATE READER (CORONA) for every hour, and fluorescent expression time was timed (plate method).

Specimen stock solution was diluted suitably, simultaneously with it, mixing dilution was carried out by desoxycholate medium (Deso mixing-dilution method), and the number of colony expressions of coliform organisms was

た。

プレート法は従来の Deso 混  
釈法とよく一致しているのがよ  
くわかり、しかも Deso 混釈法  
は最低 18 時間の培養時間が必  
要だが、プレート法は最高 8 時  
間で大腸菌群の確認ができた。  
更に、ハートインフュージョン  
を使用するよりも本発明の培地  
を使用した方が明かに蛍光発現  
時間の短縮が認められる。

measured.

Plate method is well found that it is well in  
agreement with conventional Deso  
mixing-dilution method, and although at least 18  
culture hours were required for Deso  
mixing-dilution method, check of coliform  
organisms of plate method is completed in a  
maximum of 8 hours.

Furthermore, shortening of fluorescent  
expression time is clearly observed for those  
who use medium of this invention rather than  
heart infusion.

表 - 3

食 肉 製 品	Deso混釈法 (LogCFU/g)	プ レ ー ト 法	
		ハート培地 <sup>1)</sup>	大腸菌群培地 <sup>2)</sup>
牛 挽 肉	7.1 5	+ 4 *	+ 3
牛 刺 身	3.5 9	+ 8	+ 7
牛スタミナ漬	5.2 3	+ 8	+ 7
牛ローススライス肉	6.3 2	+ 5	+ 4
アメリカンビーフ牛切り落とし	4.2 3	+ 8	+ 7
豚赤身挽肉	8.0 4	+ 4	+ 3
豚スタミナ漬	6.7 8	+ 8	+ 7
豚切り落とし	6.9 4	+ 6	+ 5
馬肉刺身 (生食)	5.2 3	+ 8	+ 7
若鳥もも小間切	5.5 1	+ 5	+ 4
若鳥ササミ	6.9 1	+ 5	+ 4
若鳥挽肉	5.8 5	+ 3	+ 3
若鳥たたき (生食)	4.1 1	+ 6	+ 5
ロースハム (スライス)	<1.0 0	—	—
ウインナーソーセージ	<1.0 0	—	—
チルドハンバーグ	<1.0 0	—	—
チルドミートボール	<1.0 0	—	—

\* : 蛍光検出時間 (時)

1) : ハートインフュージョン培地

2) : 大腸菌群検出用培地

Table - 3

First Row:

Meat product

Deso mixing-dilution method...

Plate method

Heart medium

Coliform organisms medium

*Left Column from the Second Row:*

Cow minced meat

Cow sashimi

Cow "stamina-zuke"

Cow sirloin slice meat

American beef cut-offs

Pork lean minced meat

Pork "stamina-zuke"

Pork cut-offs

Horse-meat sashimi (to be eaten raw)

Spring chicken thigh odd bits

Spring chicken white meat

Spring chicken minced meat

Spring chicken mince (to be eaten raw)

Roast ham (slice)

Vienna sausage

Chilled hamburger

Chilled meatball

\* : fluorescent detection time (hr)

1): Heart infusion medium

2): Medium for coliform organisms detection

**〔発明の効果〕**

本発明の培地は大腸菌群をジェネレーションタイムが速く、増殖率がよく、ラッグフェイズがなく増殖させることができ、大腸菌群の検出用培地として有利に使用できる。

**[Effect of the invention]**

Medium of this invention has quick generation time, and its growth ratio is good, it does not have lag phase, can proliferate coliform organisms, and can be advantageously used as a medium for detection of coliform organisms.



## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page: ["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)  
["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)